

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E

FUNZIONALI

Direttore Prof. Marco Salvatore

DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA

XVII ciclo

INDIRIZZO MORFOLOGIA UMANA NORMALE

Coordinatore Prof.ssa Stefania Montagnani

TESI DI DOTTORATO

**ALTERAZIONI STRUTTURALI DELLA LAMINA BASALE IN
LESIONI ANEURISMATICHE ASIMMETRICHE DELL’AORTA
ASCENDENTE**

**Coordinatore
Chiar.ma Prof.ssa
Stefania Montagnani**

**Dottorando
Dr. Germano Guerra**

Anno Accademico 2004 - 2005

INDICE

INTRODUZIONE.....	Pag. 3
<i>Lamina basale.....</i>	<i>Pag. 3</i>
<i>Degenerazione mediale.....</i>	<i>Pag. 7</i>
<i>Valvola aortica bicuspidè (BAV).....</i>	<i>Pag. 7</i>
<i>Scopo della tesi.....</i>	<i>Pag. 9</i>
MATERIALI E METODI.....	Pag. 10
RISULTATI.....	Pag. 18
DISCUSSIONE.....	Pag. 24
BIBLIOGRAFIA	
ICONOGRAFIA	

INTRODUZIONE

Lamina basale

La matrice extracellulare (ECM) non può essere considerata una struttura passiva, ma piuttosto una zona dinamica dove le proteine interagiscono direttamente con i recettori della superficie cellulare quali le integrine per dare il via alla trasduzione dei segnali e per modulare la funzione dei fattori di crescita e di differenziazione.

Le proteine della matrice extracellulare (ECMPs), insieme alle molecole di adesione ed alle citochine regolano le interazioni tra le cellule ed il microambiente, e dunque la differenziazione e l'architettura dei tessuti normali e neoplastici: la modulazione esercitata dalle molecole di adesione sulle cellule neoplastiche ed immuni, la distribuzione delle ECMPs e la produzione di citochine possono formare un "network" di interazione che contribuisce a regolare la crescita e la differenziazione tissutale sia in condizioni di normalità che durante la trasformazione tumorale.

Nell'ambito della matrice extracellulare la lamina basale è una sottile struttura laminare che si riscontra quale interfaccia tra l'epitelio e la sostanza fondamentale del connettivo di origine mesenchimale.

Originariamente la si interpretava come una semplice componente strutturale con compiti di barriera tissutale selettiva e di scheletro molecolare su cui far aderire le cellule epiteliali; oggi al pari di tutte le altre componenti della matrice extracellulare viene considerata un elemento fondamentale nella regolazione della crescita, differenziazione e migrazione cellulare.

Essa svolge anche un ruolo essenziale nella regolazione meccanica e funzionale dei vasi sanguigni costituendo un sensore del microambiente extracellulare per le cellule endoteliali ed i periciti.

La lamina basale presenta una significativa forza tensile e fornisce il supporto strutturale di numerose strutture quali tubuli renali, vasi sanguigni e capsula del cristallino.

Durante la contrazione dei vasi sanguigni la lamina basale che si circonda la muscolatura liscia presenta caratteristiche di flessibilità tali da consentire drastiche modificazioni di forma.

Tale plasticità è dovuta al network poligonale del Collagene di tipo IV; quest'ultimo rappresenta una componente fondamentale e la variante principale di Collagene della lamina basale del sistema cardiovascolare.

Il Collagene di tipo IV è il principale tipo di Collagene ad organizzazione non fibrillare anche detto “network-forming Collagen” per la sua capacità di autoassemblarsi in un network organizzato che è fondamentale per l'integrità la stabilità e l'organizzazione strutturale della lamina basale.

Il Collagene è la proteina più abbondante della matrice extracellulare di cui esistono due classi: il Collagene fibrillare e quello non fibrillare.

Tra quelli di tipo fibrillare annoveriamo il Collagene I ed il Collagene III mentre tra quelli di tipo non fibrillare annoveriamo il già citato collagene IV.

Il Collagene di tipo I è un eterodimero di catene $\alpha 1$ ed $\alpha 2$ ed ha distribuzione ubiquitaria nel corpo umano mentre il Collagene III è spesso espresso in associazione al Collagene I e le due forme possono essere legate covalentemente (Henkel, 1982).

Le Laminine sono una famiglia di glicoproteine costituita da omo ed eterodimeri di catene α , β e γ con peso molecolare compreso tra 140-400 KDa codificate da 8 geni correlati tra loro e variamente combinate tra loro a formare numerose isoforme.

Da un punto di vista funzionale sono anch'esse coinvolte nel legame delle cellule alla membrana basale e presenta domini di legame per le integrine, distroglicani, proteoglicani ed altri recettori per il mantenimento del fenotipo e la sopravvivenza tissutali.

Le Laminine regolano la migrazione cellulare, la proliferazione e la differenziazione durante lo sviluppo embrionale; esse influenzano anche l'adesione cellulare, la migrazione e la differenziazione nella vita adulta ed in corso di numerose condizioni patologiche.

La Laminina 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) e la Laminina 4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) che sono anche chiamate merosine, la Laminina 5 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) e la Laminina 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) are sono caratteristicamente presenti nell'uomo a livello cardiaco, muscolare scheletrico e muscolare liscio e nei vasi sanguigni (Miner, 2004).

La Fibronectina è una proteina formata da omodimeri di catene del peso molecolare di 250 KDa codificate da un unico gene anche se sono note diverse isoforme generate da splicing alternativi.

Il ruolo di questa proteina è quello di mediare l'adesione delle cellule alla matrice, e di legare attraverso differenti domini integrine, proteoglicani, collagene e fibrina.

La Tenascina (TN) ,in contrasto con tutte le altre proteine dell' ECM, comprende una famiglia di glicoproteine (TN-C TN-R, TN-W, TN-X, TN-Y) espressa tanto nei tessuti embrionali, particolarmente durante lo sviluppo neurale, l'osteogenesi e la vasculogenesi, quanto nell'adulto sia durante i normali processi di accrescimento come la rigenerazione nervosa sia durante stati patologici quali disordini vascolari, tumorigenesi, e processi metastatici.

Come le altre proteine dell'ECM l'espressione della TN è regolata da vari fattori di crescita, da citochine, da peptidi vasoattivi, da proteine della matrice e da fattori biomeccanici.

Il primo membro della famiglia delle Tenascine è la Tenascina - cytactin (TN-C), che numerosi sinonimi, i più frequenti dei quali sono myotendinous antigen, hexabrachion, cytactin, J 1220/200, neuroactina.

La TN-C ha un importante ruolo morforegolatore sia durante lo sviluppo ed il rimodellamento tissutale, sia durante gli stati patologici, in quanto regola l'adesione cellulare delle cellule neurali e di natura non neurale.

Gli altri quattro tipi di TN sono dati, in effetti, da un rimaneggiamento della molecola base della TN-C.

La TN-X fa parte di un grosso gene posto sul cromosoma 6 ed alcune combinazioni possibili su questo locus genico possono portare a svariate patologie, quali le immunodeficienze, l'artrite reumatoide giovanile.

Ha anche un importante ruolo durante lo sviluppo, dal momento che la delezione del gene TN-X esita nella sindrome di Ehlers-Danlos.

In generale, la TN presenta attività sia di adesione cellulare, sia assenza di quest'ultima, che coesistono nella molecola nativa e che sono una conseguenza del legame agli altri componenti della matrice ed ai recettori della superficie cellulare.

I recettori per la TN includono le Integrine, le molecole di adesione cellulare delle Ig e l'Annexina. L'espressione della TN-C è stata osservata per la prima volta durante la gastrulazione e la formazione del somite, a livello delle cellule della cresta neurale, poi nelle fibre gliali durante la differenziazione neuronale; inoltre, nel sistema nervoso periferico, viene espressa dalle cellule di Schwann durante la mielinizzazione.

Oltre che nel sistema nervoso, la TN-C è espressa durante la morfogenesi del tessuto osseo, del tessuto connettivo e del tessuto cardiaco e vasale.

Nell'adulto, la TN-C è espressa nei siti di neovascolarizzazione e per questo motivo è studiata particolarmente nei tumori e nelle metastasi.

Tutti gli altri membri della famiglia della TN sono co-espressi, in variabili quantità, alla TN-C, cosa che fa pensare che queste combinazioni possono rafforzare gli effetti biologici.

Per esempio, la TN-C e la TN-X sono co-esprese nel tessuto connettivo, nei tendini, nel derma, nel cuore, nel rene, nella muscolatura vasale e durante lo sviluppo neurale negli astrociti e nelle cellule di Schwann (Ikuta, 2000).

In particolare, la TN-C è espressa nei siti di rimodellamento tissutale.

Recenti studi su modelli sperimentali animali hanno dimostrato che l'overespressione di Fibronectina and Tenascina è correlata ai processi di rimodellamento dei vasi arteriosi in risposta a fattori meccanici quali lo stimolo ipertensivo (Mackie, 1992; Bardy, 1996).

Nell'aorta umana, la Fibronectina è stata rinvenuta quale componente delle membrane simili alla lamina basale che connettono le cellule muscolari lisce alle altre attraverso le fibre di ossitalano (Dingemans, 2000).

Degenerazione aneurismatica asimmetrica mediale

Recentemente, è stato documentato che l'aorta ed il suo complesso valvolare sono i costituenti di una struttura asimmetrica altamente complessa (Grande, 1998; Choo, 1999; Dagum, 1999; Lansac, 2002) in cui gli stress emodinamici non sono egualmente distribuiti lungo la circonferenza del vaso. È ben conosciuto che le modificazioni degerative sul versante mediale accompagnano il processo di invecchiamento dell'aorta normale (Schlatmann, 1977), e ciò è stato attribuito allo stress biomeccanico indotto emodinamicamente e causato dall'allungamento longitudinale e dall'effetto di estensione circonferenziale della pulsazione durante la vita (Stehbens, 1996; Robicsek, 2003).

Le modificazioni degenerative della tonaca media dell'aorta chiamate complessivamente degenerazione mediale cistica consistono in: frammentazione delle fibre elastiche, perdita delle cellule muscolari lisce, accumulo di materiale mucoide all'interno di particolari aree in cui risultano ridotte le cellule e le fibre elastiche (Schlatmann, 1977).

Questa evidenza ha contribuito allo sviluppo della teoria emodinamica che spiega la genesi della degenerazione mediale cistica.

Le comuni osservazioni macroscopiche mostrano che le dilatazioni dell'aorta ascendente tendono ad espandersi asimmetricamente con il prevalente coinvolgimento del versante convesso del vaso ed il relativo risparmio della porzione concava del vaso (Bauer, 2002; Sternik, 2002).

In accordo con tali osservazioni gli studi morfologici effettuati sin ora documentano la prevalenza statisticamente significativa di lesioni maggiormente severe a livello della faccia convessa della parete aortica (Cotrufo, 2001; Agozzino, 2002).

Valvola aortica bicuspidale (BAV)

L'espansione asimmetrica della parete aortica sembra essere ancor più pronunciata in quei casi in cui la dilatazione asimmetrica è associata a valvola aortica bicuspidale (BAV) congenita.

La valvola aortica bicuspidale congenita rappresenta uno dei più frequenti difetti congeniti dell'apparato cardiovascolare che si manifesta spesso in associazione con altri difetti congeniti cardiaci; la sua prevalenza nella popolazione mondiale è di circa l'1-2% (Ward, 2000; Bauer, 2002).

Una valvola aortica bicuspidale (anche quando questa è funzionalmente normale) è spesso associata con una dilatazione dell'aorta ascendente tipicamente localizzata a livello della porzione convessa del vaso sebbene talvolta essa possa essere uniformemente dilatata (Bauer, 2002).

I pazienti affetti da tale patologia spesso sviluppano una stenosi o un rigurgito o entrambi precocemente nel corso della vita (Bauer, 2002).

La presenza di una bicuspidia valvolare aortica aumenta notevolmente il rischio di complicanze severe quali rotture o dissecazioni aortiche (Ward, 2000; Bauer, 2002).

L'associazione tra anomalie della parete aortica e la bicuspidia valvolare può derivare da un difetto ereditario nello sviluppo delle creste neurali che sono coinvolte nell'embriogenesi sia della parete che della valvola aortica sebbene non siano stati individuati specifici difetti genici (Kappetein, 1991; Ward, 2000).

Recentemente le alterazioni nei processi di rimodellamento della matrice extracellulare (alterata sintesi, inadeguata degradazione e/o trasporto) sono state ipotizzate quali cause patogenetiche di tali difetti (Fedak, 2003; Nataatmandja 2003).

In virtù del recente crescente interesse suscitato dalle modificazioni ultrastrutturali che la caratterizzano, la degenerazione mediale delle aorte con dilatazione aneurismatica spesso accompagnata da bicuspidia valvolare (BAV), è oggi oggetto di numerosi studi ma la sua patogenesi rimane non chiara.

Alcuni autori hanno postulato che la patologia della parete aortica potrebbe essere secondaria ad una anomala emodinamica post-valvolare.

Robicsek ha evidenziato l'eccentricità del flusso sanguigno nell'aorta ascendente a valle di una valvola con bicuspidia (BAV) con conseguente ineguale distribuzione dello stress lungo la parete (Palmieri, 2001; Robicsek, 2004).

Le caratteristiche del flusso possono quindi influenzare le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali della parete dei vasi affetti da patologia (Stehbens, 1996), pertanto questo tipico pattern di asimmetria potrebbe essere dovuto alla asimmetrica espansione di un aneurisma associato a bicuspidia valvolare (BAV).

Tuttavia, altri Autori sostengono che la debolezza della parete vasale nei pazienti con valvola aortica bicuspidica (BAV) potrebbe essere geneticamente determinata piuttosto che correlata a disturbi del flusso.

Scopo dello studio

Secondo quanto a noi noto, in una sola precedente ricerca sono stati studiati attraverso metodiche immunoistochimiche i componenti della matrice extracellulare sul versante mediale della parete aortica quali fibrillina e/o elastina (Nataatmadja, 2003).

Alla luce della moderna interpretazione del ruolo della matrice extracellulare quale struttura dinamica ed altamente specializzata e coinvolta nel pathway di trasduzione del segnale, abbiamo studiato la distribuzione delle sue principali componenti: Collagene di tipo I, III, Fibronectina, Tenascina, nonché Laminina e Collagene di tipo IV che sono direttamente coinvolti nella composizione della lamina basale per determinare quali alterazioni di queste proteine sono correlate alla dilatazione della parete aortica.

Al fine di valutare la progressione dell'asimmetria nella dilatazione aneurismatica aortica abbiamo studiato la distribuzione delle suddette proteine della matrice extracellulare sia sul versante concavo che su quello convesso delle aorte dei nostri pazienti.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Il nostro studio è stato condotto su campioni ottenuti da 27 pazienti (17 uomini e 10 donne di età media di 56.3 ± 9.2 anni) affetti da bicuspidia congenita (BAV) e dilatazione aneurismatica asimmetrica dell'aortendente sottoposti ad intervento chirurgico per le suddette patologie nel periodo compreso tra gli anni 2000 e 2003 presso il Dipartimento di Chirurgia Cardiaca e dei Trapianti della Seconda Università degli Studi di Napoli sita presso l'Ospedale Vincenzo Monaldi e diretta dal Prof. Maurizio Cotrufo.

Tra i 27 pazienti inclusi nello studio 12 (7 uomini e 5 donne di età media di 59 ± 12.1 anni) erano affetti da stenosi semplice della valvola aortica mentre 15 (11 uomini e 4 donne di età media di 56.3 ± 9.2 anni) erano affetti da rigurgito isolato dell'aorta. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella Tabella 1.

Sono stati inclusi nello studio esclusivamente quei pazienti per i quali la diagnosi di valvola aortica bicuspidale congenita (BAV) posta attraverso l'esame anamnestico, ecocardiografico ed intraoperatorio era stata confermata dall'esame anatomopatologico.

Criteri di esclusione sono stati: bicuspidia aortica acquisita su base reumatica o degenerativa, aterosclerosi dell'aorta ascendente, aortite, endocardite infettiva, disordini primitivi del tessuto connettivo quale Sindrome di Marfan, bicuspidia valvolare aortica (BAV) con stenosi e rigurgito associati.

Campioni di parete aortica ottenuti da 10 donatori di cuore (di età media di 33 ± 8 anni) non aventi alcuna evidenza di lesioni aneurismatiche ed aterosclerotiche o di bicuspidia congenita (BAV) dell'aorta ascendente durante il l'espanto multiplo degli organi hanno costituito il gruppo di controllo.

Durante gli interventi chirurgici tutte le dilatazioni aneurismatiche sono apparse asimmetriche: due campioni di parete aortica a livello della porzione convessa (faccia anterolaterale destra, al di sopra

del seno non-coronario di Valsala) e di quella concava (parete opposta) 2 cm circa al di là della giunzione senotubulare sono stati prelevati preservando le condizioni di sterilità.

Da ciascun campione, sono stati ottenuti quattro frammenti, di cui, due destinati all'analisi morfologica sono stati quindi fissati in formalina tamponata, uno per la valutazione istochimica e morfometrica, uno per l'immunoistochimica ed immunofluorescenza; altri due frammenti destinati all'analisi molecolare, sono stati conservati a -80° C, uno per la valutazione proteica quantitativa mediante il Western Blot, uno per la valutazione degli acidi nucleici attraverso la reazione di retrotrascrizione a catena della polimerasi (RT-PCR).

Al fine di monitorare le variazioni nel pattern di espressione delle proteine della matrice extracellulare (ECM) abbiamo confrontato la convessità di ciascun campione di aorta con la concavità dello stesso vaso e con entrambi i versanti dei vasi di controllo.

Tutti i pazienti ed i familiari dei donatori hanno dato il loro Consenso Informato all'utilizzo dei campioni per la ricerca.

Lo studio è stato approvato dai Comitati Etici delle Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e della Seconda Università degli Studi di Napoli ed è stato svolto nel rispetto dei principi e delle norme enunciate nella Dichiarazione di Helsinki.

Ecocardiografia

L'esame ecocardiografico trans-toracico e trans-esofageo è stato eseguito utilizzando un ecocardiografo C256 Acuson Sequoia (Mountain View, California, USA) con un trasduttore multifrequenza 3V2C.

La morfologia della valvola aortica è stata valutata in proiezione parasternale sull'asse maggiore e sull'asse minore.

La diagnosi di valvola aortica bicuspidale congenita (BAV) è stata fatta quando sono state identificate solo due cuspidi in sistole ed in diastole nella proiezione sull'asse minore.

Istochimica e Morfometria

I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sottoposti a taglio al microtomo ottenendo sezioni seriate dello spessore di 4 µm.

Le sezioni sono state colorate con le seguenti colorazioni istochimiche: Ematossilina-Eosina, PAS (Acido Periodico di Schiff), Weigert-Van Geison, Alcian-PAS, Alcian-Weigert (per le fibre elastiche) e Von Kossa.

La diagnosi istologica è stata espressa utilizzando il sistema di grading proposto da Schlatmann e Becker per la degenerazione mediale.

L'analisi morfometrica è stata eseguita utilizzando due programmi (RM 2100 e RM 5200) di un sistema di analisi di immagine computerizzato (VIDAS Kontron Elektronik; Zeiss, Germania).

Per ciascun campione sono stati selezionati in maniera casuale 10 campi al microscopio (ingrandimento 620x) e sono stati valutati i seguenti parametri: il numero delle fibre elastiche, il contenuto totale di cellule muscolari lisce, il numero delle fibre muscolari lisce normali (sono state escluse le fibre con segni di degenerazione).

Sono state calcolate le medie del numero delle fibre elastiche e di quelle muscolari; inoltre è stata misurata la lunghezza delle fibre elastiche in rapporto alla loro angolazione ed alla loro densità per campo al microscopio.

Immunoistochimica

Le sezioni seriate dello spessore di 4µm sono state sottoposte a sparaffinatura, successivamente reidratate sottoposte a tre lavaggi in PBS ed immerse per 3' in H₂O₂ allo 0,3% per neutralizzare l'attività perossidasi endogena; le sezioni sono state quindi incubate con gli anticorpi primari, in camera umida per un'ora a 37° C oppure overnight a 4° C.

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti: monoclonali contro Collagene di tipo I, IV, Tenascina e Laminina (Sigma, St.Louis, Missouri, USA), policlonali contro Fibronectina (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) e Collagene di tipo III (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA, USA).

I vetrini sono stati quindi sottoposti a numerosi lavaggi in PBS e poi incubati con gli anticorpi secondari sviluppati in coniglio e coniugati con perossidasi (Dako, Carpenteria CA, U.S.A.), in camera umida per un'ora a 37° C.

Le sezioni dopo essere state lavate ripetutamente in PBS sono state incubate con il complesso avitina-biotina perossidasi (ABC/HRP; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) per 30'.

La reazione di colorazione è stata sviluppata con una soluzione di 0,6 mg/ml di DAB (diaminobenzidina idrocloride) contenente H₂O₂ allo 0,03% per 10'.

Le sezioni sono infine state sottoposte a colorazione nucleare con Ematossilina e successivamente montate in soluzione acquosa di glicerolo.

L'osservazione è stata fatta con un microscopio Leica DMLB (Leica Microsystem, Inc, Bannockburn, III, Germania) connesso ad un PC attraverso una fotocamera digitale Leica LC200.

Immunofluorescenza

Le sezioni seriate dello spessore di 4µm sono state sottoposte a sparaffinatura, successivamente reidratate e quindi incubate con gli anticorpi primari, in camera umida per un'ora a 37° C oppure overnight a 4° C.

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti: monoclonali contro Collagene di tipo I, IV, Tenascina e Laminina (Sigma, St.Louis, Missouri, USA), policlonali contro Fibronectina (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) e Collagene di tipo III (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA, USA).

I vetrini sono stati quindi sottoposti a numerosi lavaggi in PBS e poi incubati con gli anticorpi secondari sviluppati in asino: IgG anti-topo, anti-coniglio e anti-capra coniugati con rodamina o fluoresceina (Sigma, St.Louis, Missouri, USA), in camera umida per un'ora a 37° C.

Dopo ulteriore lavaggio in PBS, i vetrini sono stati incubati per 10' a temperatura ambiente con Propidio Ioduro per la colorazione nucleare e successivamente le sezioni sono state montate in Vectashield (Vector Laboratoires, Burlingame, California, USA).

L'osservazione è stata fatta con un microscopio Leica DMLB (Leica Microsystem, Inc, Bannockburn, III, Germania) equipaggiato per l'epifluorescenza e connesso ad un PC attraverso una fotocamera digitale Leica LC200 e con un microscopio confocale Zeiss LSM510 (Karl Zeiss International, Jena, Germania).

I campioni sono stati valutati da tre osservatori indipendenti utilizzando una scala arbitraria di 4 valori che vanno dall'assenza di immunopositività (-) a quella massima (+++).

Western Blot

I campioni sono stati lavati in PBS e lisati incubandoli per 30' a 4° C con un buffer di lisi (1% Triton X-100 in PBS), contenente inibitori delle proteasi alle concentrazioni riportate nel seguente schema:

- EDTA 10 µl
- PMSF 10 µl
- Tripsina/chimotripsina 10 µl
- Leupeptina 4.6 µl
- E-64 3.6 µl
- Aprotinina 10 µl

I lisati sono stati centrifugati per 30' a 10000 rpm (rotazioni per minuto) a 4° C; la concentrazione di proteine nei campioni è stata dosata usando un kit colorimetrico (Bio-Rad, Richmond, CO, USA).

Attraverso la lettura spettrofotometrica a 750 nm è stato possibile ottenere i valori dell'assorbanza, che hanno permesso di costruire la retta di taratura necessaria alla determinazione della concentrazione dei campioni.

Una eguale quantità di proteine totali pari a 100 µg è stata aggiunta al Laemmli buffer quindi separata su un gel di SDS (sodio dodecil solfato)-acrilammide al 30 % in condizioni denaturanti.

Il gel è stato successivamente sottoposto ad elettroblotting su una membrana di PVDF (polyvinylidene difluoride) (Millipore, Bedford, Mass., USA) e le bande così ottenute sono state evidenziate colorando la membrana con il colorante di Ponceau.

Il colorante in eccesso è stato rimosso mediante successivi lavaggi in PBS tween 20 e la membrana è stata posta in una capsula Petri e bloccata per 1h in latte privo di grassi al 6%.

Rimosso il latte, dopo tre lavaggi in opportuna soluzione di lavaggio la membrana è stata incubata overnight a 4°C con gli anticorpi primari contro Collagene di tipo I, III, IV, Tenascina e Laminina (Sigma, St.Louis, Missouri, USA), e anti-Fibronectina (Chemicon Int, Temecula, California, USA).

La membrana è stata quindi lavata in PBS tween 20 per 30' e successivamente incubata in latte in presenza dell'anticorpo secondario.

Per la rivelazione dell'anticorpo primario specifico sono state usate IgG di capra anti-topo complessate con perossidasi alcalina di rafano, alla diluizione di 1:3000 (Bio-Rad, Richmond, CO, USA), con una incubazione di 45' a temperatura ambiente.

Dopo ulteriori lavaggi in PBS tween 20, la membrana è stata visualizzata dopo essere stata sviluppata in luminol ed esposta su ECL film (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) per Collagene I, III, IV, Laminina e Fibronectina e ECLplus (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) per Tenascina.

Le immagini ottenute sono state acquisite al computer e quantificate attraverso l'utilizzo di un software analitico ImageQuant (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

I campioni (150-300 mg) di parete aortica criopreservati a -80° C sono stati lisati con la soluzione di Triazol (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, Md, USA), secondo il protocollo consigliato dalla ditta per ottenere l'RNA totale.

L'RNA totale è stato isolato e quindi precipitato e quantizzato mediante analisi spettrofotometrica con lo spettrofotometro Eppendorf Bio Photometer (Eppendorf AG, Germania) leggendo i valori di assorbanza a 260 nm e 280 nm.

Per stimare la qualità dell'RNA estratto si valuta il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm (DNA) e quella a 280 nm (proteine) con un rapporto ideale intorno a 1.8 - 2.

Per ogni campione 2 µg dell'RNA totale sono stati retrotrascritti in cDNA (DNA complementare), usando il kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, Illinois, USA) secondo il protocollo consigliato dalla ditta.

Il cDNA (3 µl) di ciascun campione è stato amplificato con una RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) utilizzando un set di primer preparati per i geni delle proteine della matrice extracellulare studiate e per il gene housekeeping GAPDH (Gliceraldeide fosfato deidrogenasi) utilizzato quale doppio controllo interno alla reazione.

Il rapporto tra i campioni ed il gene housekeeping è stato calcolato per normalizzare le variazioni iniziali tra la concentrazione dei campioni e per il controllo dell'efficienza della reazione.

I primer sono stati disegnati utilizzando il software Primer 3 (sviluppato da Steve Rozen, Helen J Skaletsky) disponibile on-line al seguente indirizzo web: <http://www-genome.wi.mit.edu> e sono riassunti nella Tabella 2.

È stata poi effettuata una PCR semiquantitativa utilizzando un ciclatore termico Techgene Thermal Cycler (Krackler Scientific Inc., USA) secondo il seguente protocollo: denaturazione iniziale a 95°C per 5'; 25 cicli successivi effettuati a 95°C per 1'; 55°C per 1'(temperatura di annealing); a 72°C per 1'; estensione finale a 72°C per 10'.

Il volume totale della reazione è stato di 50 µl che comprendevano: 3 µl di CDNA, 10-20 pmol di ciascun primer, 200 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM buffer di reazione, RNase e DNase free H₂O.

In ciascun esperimento la possibile contaminazione del DNA è stata determinata introducendo un controllo interno in cui il cDNA è stato omesso dalla mix di reazione e sostituito da RNase e DNase free H₂O.

Ogni prodotto amplificato (12 µl) è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio; il gel è stato poi osservato su di un transilluminatore agli UV (luce ultravioletta), fotografato e le immagini sono state acquisite al computer.

I livelli dell' RNA messaggero (mRNA) delle proteine studiate sono stati infine valutati attraverso lettura densitometrica e normalizzati con i valori del GAPDH.

L'analisi densitometrica è stata fatta utilizzando il software ImageJ v1.29 (sviluppato da Wayne Rasband) disponibile on-line all'indirizzo web <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Tutti i prodotti della PCR sono stati purificati utilizzando il QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) e la loro sequenza è stata verificata attraverso il metodo chimico di terminazione del didesossi, sequenziando il DNA secondo il forward ed il reverse con un sequenziatore automatico Applied biosystem Model 373A (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Analisi statistica

Il software SPSS (versione 10.1; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) è stato utilizzato per l'analisi statistica.

Le variabili continue sono state espresse come media \pm DS (Deviazione Standard).

I valori della morfometria, Western Blot, e PCR sono stati confrontati con un test del tipo *t* di Student per variabili non appaiate.

Le differenze tra i tre gruppi (controlli, rigurgitanti e stenotici) sono stati analizzati attraverso l'analisi della varianza con la correzione di Bonferroni.

RISULTATI

Ecocardiografia

L'esame ecocardiografico ha mostrato un diametro medio dell'aorta ascendente di 5.5 ± 1.01 cm nei pazienti con rigurgito e di 5.7 ± 1.02 in quelli con stenosi ($P = 0.42$).

In tutti i pazienti partecipanti allo studio il diametro maggiore è stato riscontrato oltre la cresta senotubulare, a livello del tratto tubulare.

I pattern di fusione delle cuspidi sono descritte durante l'esame ecocardiografico o riportate dal chirurgo nelle note operatorie.

Tra i 15 pazienti con rigurgito 12 avevano un grado severo di rigurgito valvolare e 3 un grado moderato; tra quelli con stenosi valvolare 10 mostravano un grado severo e 2 un grado moderato.

Tutti i risultati relativi alle variazioni della morfologia valvolare ed alle caratteristiche cliniche sono riassunte nella Tabella 1.

Istochimica e Morfometria

All'esame istologico i campioni ottenuti da tutti i pazienti hanno mostrato una degenerazione mediale.

Il grado medio di degenerazione mediale nei pazienti con stenosi è stato di 2.7 ± 0.5 sul versante convesso del vaso rispetto a 1.8 ± 0.6 osservato sul versante concavo ($P < .001$); nei pazienti con rigurgito esso è stato di 2.5 ± 0.5 sul lato convesso contro 1.7 ± 0.6 sul lato concavo ($P < .001$).

I dati completi della valutazione morfometrica sono riassunti nella Tabella 3.

All'osservazione microscopica il numero totale delle fibrocellule muscolari lisce ed il numero relativo di quelle normali rispetto a quelle con alterazioni istologiche è risultato ridotto a livello della porzione convessa del vaso rispetto a quella concava sia nel gruppo con bicuspidia aortica congenita (BAV) associata a rigurgito che nel gruppo con bicuspidia aortica congenita associata a stenosi.

In entrambi i gruppi è stato osservato un incremento delle fibre elastiche a livello della convessità del vaso rispetto alla concavità.

Le fibre osservate si presentano di lunghezza ridotta per effetto della frammentazione dell'elastina apparendo pertanto aumentate di numero.

Il confronto complessivo dei dati istochimici e morfometrici tra soggetti con bicuspidia aortica congenita (BAV) associata a rigurgito e stenosi non ha mostrato differenze significative.

Immunoistochimica

L'osservazione morfologica delle proteine della matrice extracellulare del tessuto aortico mostra modificazioni significative nell'organizzazione tridimensionale delle componenti principali della parete vasale.

Lo spessore della parete aortica rilevato nei controlli normali è stato di 1.82 ± 0.05 mm a livello della porzione concava del vaso mentre è stato di 1.92 ± 0.05 mm a livello della porzione convessa. I campioni patologici valutati complessivamente hanno mostrato in tutti i casi una riduzione dello spessore della parete vasale che è stato di 1.18 ± 0.04 mm a livello della concavità e di 1.13 ± 0.06 mm, a livello della convessità rispettivamente.

Suddividendo i campioni patologici secondo il fenotipo rigurgitante e stenotico sono stati osservati valori di 1.313 ± 0.06 a livello della concavità e di 1.24 ± 0.04 a livello della convessità nei primi, di 1.12 ± 0.04 a livello della porzione concava del vaso e di 0.97 ± 0.06 a livello di quella convessa, nei secondi.

L'organizzazione tridimensionale della componente fibrillare risulta marcatamente alterata a livello sia della tonaca media che di quella intima.

Le nostre valutazioni ottenute dall'osservazione dei preparati al microscopio ottico, al microscopio a fluorescenza ed al microscopio confocale sono riassunte nella Tabella 4.

L'espressione delle proteine della matrice extracellulare è risultata sostanzialmente uniforme tra concavità e convessità nel gruppo di controllo.

Fibronectina e Laminina sono state riscontrate in notevole quantità nella tonaca intima ed in quella media.

Il Collagene di tipo III è risultato irregolarmente distribuito a livello di entrambe le pareti del vaso.

Il Collagene di tipo IV è risultato virtualmente assente all'osservazione dopo colorazione immunoistochimica.

Il Collagene di tipo I come ci si attendeva è stato riscontrato in quantità notevole.

Le molecole di Collagene di tipo I e di tipo III hanno mostrato la medesima distribuzione sia a livello della concavità che a livello della convessità del vaso nei soggetti affetti da dilatazione aneurismatica asimmetrica associata a bicuspidia aortica congenita (BAV); nei soggetti di controllo si riscontra tuttavia una generale riduzione della distribuzione di queste proteine.

Il Collagene di tipo IV Collagen è presente in quantità maggiore nelle aorte patologiche in particolare a livello del versante concavo del vaso.

L'immunopositività per Laminina si reduce nelle aorte affette da dilatazione aneurismatica asimmetrica (Fig. 1); la Fibronectina viceversa risulta leggermente aumentata a livello del versante concavo delle aorte affette dalla succitata patologia.

L'immunopositività per Tenascina è in genere ridotta a livello della tonaca intima delle aorte dei soggetti di controllo; nei soggetti affetti da aneurisma asimmetrico dell'aorta ascendente la quantità di tale proteina aumenta notevolmente a livello della parete del vaso in particolare in corrispondenza del versante convesso (Fig. 2).

Tutte le alterazioni della distribuzione delle proteine della matrice extracellulare sono state riscontrate a livello della tonaca media, tuttavia occasionalmente sono state rinvenute alterazioni dell'architettura generale della matrice extracellulare a livello delle altre tonache.

Western Blot

L'analisi quantitativa del contenuto proteico eseguita mediante Western Blot mostra una ridotta produzione di Collagene di tipo I e di tipo III nei campioni di aorte affette da dilatazione aneurismatica asimmetrica senza tuttavia evidenziare alcuna differenza tra il versante concavo e quello convesso del vaso.

I livelli di Collagene di tipo IV e di Tenascina risultano incrementati nei campioni patologici; nelle aorte dei pazienti che presentano associata alla dilatazione aneurismatica una bicuspidia valvolare congenita con fenotipo stenotico la quantità di Collagene IV è risultata maggiore a livello del versante convesso del vaso ($P < 0.018$) mentre nelle aorte dei pazienti che presentano associata alla dilatazione aneurismatica una bicuspidia valvolare congenita con fenotipo rigurgitante i livelli della proteina sono risultati incrementati a livello della concavità ($P < 0.001$) (Fig 3-4).

Il basso livello assoluto di Tenascina ha richiesto l'utilizzo di sistemi di rilevamento di quantità infinitesimali di detta proteina il cui quantitativo risulta pertanto espresso in fentomoli mentre i livelli delle altre proteine della matrice extracellulare studiate risultano espressi in nanomoli.

La Fibronectina è presente in quantità maggiori nei soggetti normali rispetto ai soggetti con dilatazione aneurismatica senza tuttavia che le differenze tra i due gruppi siano statisticamente significative; non si osservano inoltre significative differenze tra la concavità e la convessità.

Le differenti catene della Laminina presentano una distribuzione quantitativa abbastanza disomogenea.

Nelle aorte di controllo la quantità della proteina è significativamente maggiore a livello della concavità rispetto alla convessità ($P < 0.01$); essa appare incrementata a livello della convessità nelle aorte dei pazienti che presentano associata alla dilatazione aneurismatica una bicuspidia valvolare congenita con fenotipo rigurgitante mentre risulta ridotta nei campioni di pazienti che presentano associata alla dilatazione aneurismatica una bicuspidia valvolare congenita con fenotipo stenotico.

Le catene β_1 e β_2 mostrano una distribuzione significativamente diversa; mentre le catene β_2 sono apparse scarsamente espresse in tutti i campioni e totalmente assenti a livello del versante concavo delle aorte affette da dilatazione aneurismatica, le catene β_1 sono risultate aumentate in tutti i campioni e solo leggermente ridotte nelle aorte con aneurisma (Fig. 3).

La catena α_2 è espressa in quantità significativamente ridotta nelle aorte patologiche (Fig. 3).

I risultati dell'analisi del contenuto proteico mediante Western Blot sono riassunti nella Tabella 5.

RT-PCR Semiquantitativa

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) ci ha fornito informazioni circa i livelli di espressione dell'mRNA delle proteine della matrice extracellulare studiate.

La grande variabilità tra i pazienti riscontrata a proposito della Fibronectina è stata confermata anche dall'espressione dell'mRNA con una leggera riduzione nelle aorte patologiche rispetto a quelle normali.

Il livello dell'mRNA per la catena $\alpha 2$ della Laminina risulta sempre significativamente ridotto sia a livello del versante concavo che a livello di quello concavo delle aorte di pazienti con dilatazione aneurismatica rispetto ai campioni di controllo (Fig. 5-6).

Per quanto riguarda la famiglia delle Tenascine l'unica variante per la quale siamo stati in grado di valutare l'mRNA è stata la Tenascina X, i cui RNA messaggeri risultano chiaramente aumentati nei campioni patologici rispetto ai controlli; questo incremento è maggiormente evidente a livello del versante convesso del vaso rispetto a quello concavo (Fig. 5-6).

L'mRNA del Collagene di tipo I risulta leggermente ridotto nei campioni patologici rispetto ai controlli; tale riduzione è maggiormente evidente nelle aorte dei pazienti che presentano associata alla dilatazione aneurismatica una bicuspidia valvolare congenita con fenotipo rigurgitante.

Non si osservano differenze nell'espressione dell'mRNA tra il versante concavo e quello convesso del vaso nei tre gruppi (normali, soggetti con aneurisma associato a BAV con stenosi, soggetti con aneurisma associato a BAV con rigurgito).

Il livello dell'mRNA per il Collagene di tipo III risulta ridotto nei campioni di soggetti con aneurisma associato a BAV con rigurgito rispetto ai campioni di controllo; i campioni di soggetti con aneurisma associato a BAV con stenosi non mostrano viceversa alcuna differenza sostanziale rispetto ai soggetti normali.

Nei pazienti che presentano associata alla dilatazione aneurismatica una bicuspidia valvolare congenita con rigurgito la riduzione dell'RNA messaggero è significativamente più marcata a livello della concavità ($P < 0.01$).

L'mRNA per il Collagene di tipo IV è significativamente più espresso nella parete delle aorte affette da dilatazione aneurismatica con una bicuspidia valvolare congenita e rigurgito ($P < 0.22$) ed in quelle affette da dilatazione aneurismatica con una bicuspidia valvolare congenita e stenosi ($P < 0.07$) rispetto a quelle normali; la maggiore espressione del messaggero è più evidente a livello della porzione concava della parete vasale rispetto a quella convessa.

DISCUSSIONE

Da quanto risulta da un attento esame della letteratura, la nostra ricerca rappresenta il primo studio morfo-biomolecolare sul pattern di distribuzione ed espressione delle principali componenti della matrice extracellulare nelle lesioni della tonaca media di aorte affette da dilatazione aneurismatica asimmetrica.

La lamina basale della parete aortica di soggetti con dilatazione aneurismatica presenta importanti modificazioni dell'architettura tridimensionale delle principali componenti.

Tutti i vasi esaminati hanno mostrato una parete più sottile rispetto ai campioni di controllo.

I nostri dati ricavati dall'osservazione con il microscopio ottico mostrano che le dilatazioni aneurismatiche dell'aorta ascendente tendono ad espandersi asimmetricamente con un prevalente coinvolgimento della parete convessa del vaso.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che esiste una differenza statisticamente significativa tra la quantità e la distribuzione della catena $\alpha 2$ della Laminina, Tenascina e Collagene di tipo IV.

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) ed il Western Blot hanno rivelato una disomogenea distribuzione delle catene $\alpha 2$, $\beta 1$ and $\beta 2$ a livello della concavità e della convessità sia delle aorte affette da dilatazione asimmetrica che di quelle di controllo.

La catena $\beta 1$ è chiaramente ben espressa in tutti i campioni mentre la catena $\beta 2$ è sempre scarsamente espressa e totalmente assente a livello della concavità delle aorte con dilatazione aneurismatica asimmetrica.

L'mRNA la catena $\alpha 2$ è sempre ridotto sia a livello della concavità che a livello della convessità nei campioni patologici rispetto a quelli normali.

Queste osservazioni suggeriscono che le Laminine 8 and 10 potrebbero essere le isoforme di Laminina tra quelle maggiormente presenti nei vasi sanguigni che prevalgono nelle aorte con dilatazione aneurismatica asimmetrica.

Infatti, le Laminine 4 and 2 contengono catene $\alpha 2$ che si riducono in tutti i campioni patologici; le Laminine 3, 9 and 11 contengono catene $\beta 2$ che sono virtualmente assenti nei nostri campioni.

La distribuzione delle differenti catene nelle diverse isoforme è riassunta nella Tabella 6.

La quantità di Collagene di tipo IV nei vasi affetti da dilatazione aneurismatica è fortemente incrementata rispetto ai vasi normali e la sua distribuzione, che è uniforme nella parete aortica normale, diventa irregolare nei campioni patologici.

Una differenza statisticamente significativa nel quantitativo e nella distribuzione del Collagene di tipo IV, Tenascina e Laminina è evidente tra la concavità e la convessità degli stessi campioni di aorta e rispetto ai soggetti normali.

Inoltre, il riarrangiamento strutturale del Collagene di tipo I, che è considerato lo scheletro meccanico dei vasi, è fortemente alterata e mediamente disomogeneo lungo l'intera estensione della tonaca media, anche il suo quantitativo mostra forti differenze.

I dati biomolecolari confermano sostanzialmente le osservazioni morfologiche, con la sola eccezione della Fibronectina; questa leggera differenza non è significativa ed è dovuta alla necessità di utilizzare differenti anticorpi per le due metodiche.

La sintesi delle componenti della matrice extracellulare può variare, come dimostrato dal quantitativo ridotto di Tenascina nelle aorte normali e dall'incremento nella sintesi di questa proteina nei vasi affetti da dilatazione, in particolare a livello della convessità.

Da questo punto di vista, la biologia molecolare mostra uno scarso quantitativo di Tenascina che sono naturalmente indetectabili con le tecniche morfologiche.

Lo spessore della parete aortica dei soggetti affetti da aneurisma varia, con un decremento costante nei vasi dilatati rispetto ai normali.

La complessità delle interazioni cellula-matrice ha impedito sino ad ora una interpretazione esaustiva del significato delle anomalie delle proteine negli aneurismi aortici.

Ulteriori informazioni saranno acquisite in un prossimo futuro attraverso il confronto tra la parete aortica dilatata in pazienti con bicuspidia valvolare (BAV) e aneurismi maggiormente simmetrici in pazienti con tricuspida aortica ed attraverso il confronto tra i pazienti con bicuspidia valvolare (BAV) con e senza dilatazione.

Nondimeno, i nostri dati, che mostrano il pattern di espressione di alcune delle componenti della matrice extracellulare e della lamina basale in corso di dilatazione asimmetrica, supporta l'ipotesi che esistano alcune correlazioni tra i disturbi del flusso dovuti alla direzione eccentrica del flusso sanguigno e la bicuspidia valvolare aortica e lo sviluppo della dilatazione aortica.

È noto che le cellule muscolari della parete aortica reagiscono allo stress sulla parete attraverso modificazioni del fenotipo e producendo componenti della matrice extracellulare (quali Collagene di tipo IV e Tenascina) ed enzimi che eventualmente degradano i normali costituenti strutturali (quali Elastina e Collageni) (Bardy 1996, Mackie 1992).

È stato difficile, in precedenza, comprendere perchè le singole molecole della lamina basale siano affette da alterazioni differenti: per ragioni sconosciute il meccanismo di overproduzione proteica sembra prevalere per alcune proteine (es. Tenascina) mentre l'overdegradazione o l'ipoespressione prevale per altre (es. Laminina).

Le proprietà meccaniche della parete aortica potrebbe essere fortemente modificata da questi fenomeni di rimodellamento, che probabilmente induce una riduzione localizzata della resistenza della parete vasale al flusso sanguigno con conseguente dilatazione, con prevalenza a livello della convessità dove lo stress a livello della parete è maggiore.

In particolare, un significativo incremento della Tenascina potrebbe essere una reazione fisiologica allo stress meccanico sulla parete.

Ulteriori ricerche sono necessarie per chiarire il ruolo delle catene $\alpha 2$ and $\beta 1$ della Laminina nel rimodellamento tissutale; in precedenza, la Laminina 2 sembra candidata ai cambiamenti più significativi.

Il decremento di questa isoforma, chiamata anche merosina, gioca un ruolo importante in numerose patologie caratterizzate da debolezza (Jones, 2001).

Sulla base di questi risultati, appare chiaro che se esiste una debolezza della parete vasale geneticamente mediate, ciò può predisporre alla degenerazione della parete arteriosa quando è localmente sottoposta a flusso elevato e stress radente.

Evidenze conclusive di tale fenomeno saranno raggiunte solo quando saranno identificati i geni coinvolti ed i loro meccanismi regolatori chiariti incluse le influenze ambientali.

BIBLIOGRAFIA

1. Agozzino L, Ferraraccio F, Esposito S, et al. Medial degeneration does not involve uniformly the whole ascending aorta: morphological, biochemical and clinical correlations. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21:675-82.
2. Bardy N, Merval R, Benessiano J, et al. Pressure and angiotensin II synergistically induce aortic fibronectin expression in organ culture model of rabbit aorta. Evidence for a pressure-induced tissue renin-angiotensin system. *Circ Res* 1996; 79:70-8.
3. Bauer M, Pasic M, Schaffarzyk R et al. Reduction aortoplasty for dilatation of the ascending aorta in patients with bicuspid aortic valve. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73:720-3; discussion 724.
4. Beller CJ, Labrosse MR, Thubrikar MJ, Robicsek F. Role of aortic root motion in the pathogenesis of aortic dissection. *Circulation* 2004; 109:763-769.
5. Bonderman D, Gharehbaghi-Schnell E, Wollenek G, Maurer G, Baumbgartner H, Lang IM. Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation* 1999; 99:2138-2143.
6. Choo SJ, McRae G, Olomon JP, et al. Aortic root geometry: pattern of differences between leaflets and sinuses of Valsalva. *J Heart Valve Dis* 1999; 8:407-15.

7. Cotrufo M, De Santo LS, Esposito S, et al. Asymmetric medial degeneration of the intrapericardial aorta in aortic valve disease. *Int J Cardiol* 2001; 81:37-41.
8. Cotrufo M, Della Corte A, De Santo LS, De Feo M, Covino FE, Dialetto G. Asymmetric medial degeneration of the ascending aorta in aortic valve disease: a pilot study of surgical management. *J Heart Valve Dis.* 2003 Mar;12(2):127-33; discussion 134-5.
9. Dagum P, Green GR, Nistal FJ, et al. Deformational dynamics of the aortic root: modes and physiologic determinants. *Circulation* 1999; 100:II54-62.
10. Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, et al. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec* 2000; 258:1-14.
11. Fedak PW, de Sa MP, Verma S, et al. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126:797-806.
12. Fox WM, Hameed A, Hutchins GM, Reitz BA, Baumgartner WA, Beshorner WE et al. Perforin expression localizing cytotoxic lymphocytes in the intimas of coronary arteries with transplant-related arteriosclerosis. *Hum Pathol* 1993; 24:477-482.
13. Grande KJ, Cochran RP, Reinhall PG, et al. Stress variations in the human aortic root and valve: the role of anatomic asymmetry. *Ann Biomed Eng* 1998; 26:534-45.

14. Hedin U, Holm J, Hansoon GK. Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol* 1991; 139:649-656.
15. Henkel W, Glanville RW. Covalent cross-linking between molecules of type I and type III collagen. The involvement of the N-terminal, nonhelical region of the alpha I (I) and alpha I (III) chains in the formation of intermolecular cross-links. *Eur J Biochem* 1982; 122:205-213.
16. Ikuta T, Ariga H, Matsumoto K. Extracellular matrix tenascin-X in combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation. *Genes Cells* 2000; 5:913-927.
17. Jones KJ, Morgan G, Johnston H, Tobias V, et al. The expanding phenotype of laminin $\alpha 2$ chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J Med Genet* 2001; 38:649-657.
18. Kappetein AP, Gittenberger-de Groot AC, Zwinderman AH, Rohmer J, Poelmann RE, Huysmans HA. The neural crest as a possible pathogenetic factor in coarctation of the aorta and bicuspid aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102:830-836.
19. Lansac E, Lim HS, Shomura Y, et al. A four-dimensional study of the aortic root dynamics. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 22:497-503.
20. Lehoux F, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech* 2003; 36:631-643.

21. Mackie EJ, Scott-Burden T, Hahn AW, et al. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol.* 1992; 141:377-88.
22. Matthias Bechtel JF, Noack F, Sayk F, Erasmi AW, Bartels C, Sievers HH. Histopathological grading of ascending aortic aneurysm: comparison of patients with bicuspid versus tricuspid aortic valve. *J Heart Valve Dis* 2003; 12:54-61.
23. Miner JH and Yurchenco PD: Laminin Functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004; 20:255-84.
24. Nataatmadja M, West M, West J, et al. Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation* 2003; 108 Suppl 1:II329-34.
25. Nistri S, Sorbo MD, Marin M, Palisi M, Scognamiglio R, Thiene G. Aortic root dilatation in young men with normally functioning bicuspid aortic valves. *Heart* 1999; 82:19-22.
26. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Grimm RA, Smedira N, Griffin BP. Features and predictors of ascending aortic dilatation in association with a congenital bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 2003; 92:99-101.
27. Palmieri V, Bella JN, Arnett DK, et al. Aortic root dilatation at sinuses of Valsalva and aortic regurgitation in hypertensive and normotensive subjects: the Hypertension Genetic Epidemiology Network Study. *Hypertension* 2001; 37:1229-35.

28. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Cancer Biology* 2002; 12:197-207.
29. Robicsek F. Bicuspid versus tricuspid aortic valves. *J Heart Valve Dis.* 2003; 12:52-3.
30. Robicsek F, Thubrikar MJ, Cook JW, Fowler B. The congenitally bicuspid aortic valve: how does it function? why does it fail? *Ann Thorac Surg* 2004; 77:177-85.
31. Schlatmann TJ, Becker AE. Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aortic aneurysm. *Am J Cardiol* 1977; 39:13-20.
32. Sho E, Sho M, Singh TM, Nanjo H, Komatsu M, Xu C. et al. Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix. *Exp Mol Pathol* 2002; 73:142-153.
33. Stehbens WE. Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. *Acta Anat* 1996; 157:261-74.
34. Sternik L, Zehr KJ, Schaff HV. A method of repair for asymmetric aneurysmal dilatation of the ascending aorta. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73:1332-4.
35. Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A. Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res* 1994; 276:263-271.

36. Ward C. Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart* 2000; 83:81-85.

N° Paziente	Età	Sesso	BSA (m ²)	BAV	Grado	Aorta (cm)	Pattern fusione
1	48	M	2.00	Rigurgito	4+	5.0	Sinistra/Destra
2	44	M	2.20	Rigurgito	4+	6.5	Sinistra/Destra
3	60	F	1.52	Rigurgito	4+	4.5	Destra/Non coronario
4	57	M	1.70	Rigurgito	3+	5.0	Sinistra/Destra
5	65	M	2.20	Rigurgito	4+	6.0	Non disponibile*
6	66	M	1.67	Rigurgito	4+	4.8	Destra/Non coronario
7	49	M	1.83	Rigurgito	4+	5.1	Sinistra/Destra
8	50	F	1.84	Rigurgito	4+	4.9	Sinistra/Destra
9	63	M	1.82	Rigurgito	4+	5.0	Destra/Non coronario
10	70	F	1.82	Rigurgito	3+	8.3	Sinistra/Destra
11	61	M	1.73	Rigurgito	4+	6.2	Non disponibile*
12	67	M	1.66	Rigurgito	4+	4.9	Destra/Non coronario
13	47	M	1.60	Rigurgito	4+	4.7	Sinistra/Destra
14	41	M	1.94	Rigurgito	4+	6.4	Non disponibile*
15	56	F	2.10	Rigurgito	3+	5.8	Sinistra/Destra
16	47	M	1.84	Stenosi	4+	5.5	Sinistra/Destra
17	74	F	1.83	Stenosi	4+	4.6	Destra/Non coronario
18	60	M	1.82	Stenosi	4+	4.7	Destra/Non coronario
19	75	M	1.71	Stenosi	4+	5.0	Non disponibile*
20	45	F	1.74	Stenosi	3+	6.2	Sinistra/Destra
21	71	M	1.70	Stenosi	4+	4.5	Destra/Non coronario
22	55	F	1.90	Stenosi	4+	5.7	Sinistra/Destra
23	58	F	1.81	Stenosi	4+	6.0	Non disponibile*
24	74	M	1.84	Stenosi	4+	5.4	Destra/Non coronario
25	55	F	1.77	Stenosi	3+	6.5	Sinistra/Destra
26	47	M	1.86	Stenosi	4+	7.4	Destra/Non coronario
27	43	M	1.96	Stenosi	4+	7.5	Non disponibile*

*BAV, valvola aortica bicuspidè; BSA, area di superficie corporea; * non identificata all'esame ecocardiografico o non riportata nelle note operatorie*

Tabella 1

Sequenze oligonucleotidiche utilizzate per l'RT-PCR semiquantitativa

<i>Target mRNA</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenze</i>	<i>PCR product (bp)</i>
GAPDH	Forward	5'GAGTCAACGGATTGCTC ^{3'}	238
	Reverse	5'TTGATTTTGGAGGGATCT ^{3'}	
Fibronectin	Forward	5'CCCAACTGGCATTGACTTTT ^{3'}	136
	Reverse	5'CTCGAGGTCTTTCACTGAAG ^{3'}	
Laminin α -2	Forward	5'AAAGTATCTGTGTCTTCAGGAGGTGC ^{3'}	474
	Reverse	5'GCAGCCAGTGAATGTAATCACACGTC ^{3'}	
Collagen I α -1	Forward	5'CTCCCCAGAAGACACAGGAA ^{3'}	203
	Reverse	5'TCAAAAACGAAGGGGAGATG ^{3'}	
Collagen IV α -2	Forward	5'CCAAGGAAGAGGTGGTGT ^{3'}	169
	Reverse	5'GTGCTTCACCAGGAGGTA ^{3'}	
Tenascin-X	Forward	5'CCTTGTCTCCACACCAA ^{3'}	227
	Reverse	5'GGATCTCCTGGTTCTGTC ^{3'}	

Tabella 2

Variabile	BAVs con Rigurgito			BAVs con Stenosi		
	Convessità	Concavità	Valore P*	Convessità	Concavità	Valore P*
Totale Cellule muscolari lisce	274 ± 132.8	590 ± 214.2	.001	356.7 ± 36.9	622.3 ± 180.6	0.14
Cellule muscolari lisce normali	205 ± 127.3	562 ± 73.9	.008	207 ± 165.1	437 ± 73.9	.017
Numero di fibre elastiche	949.3 ± 513.9	637.9 ± 333.7	.165	937.5 ± 188.4	616.4 ± 260.8	.002
Lunghezza massima fibre elastiche	11.52 ± 4.7	13.01 ± 2.5	.232	10.57 ± 4.1	13.62 ± 1.9	.032
Lunghezza minima fibre elastiche	0.41 ± 0.1	1.43 ± 0.2	<.001	0.22 ± 0.2	1.46 ± 0.6	.029

*BAV, valvola aortica bicuspid; *Concavità vs Convessità*

Tabella 3

Variable	Collagen			Fibronectin	Tenascin	Laminin
	I	III	IV			
Normal						
Convexity	++	+	+/-	+	+/-	+ / ++
Concavity	++	+ / ++	+/-	+	+/-	++
Regurgitant BAV						
Convexity	+/-	+/-	+	++	+	+
Concavity	+/-	+/-	++	+	+/-	++
Stenotic BAV						
Convexity	+/-	+/-	++	+++	++	+
Concavity	+	+	+++	++	++	+/-

Tabella 4

Variable	Normal	Regurgitant BAV	Stenotic BAV	<i>P</i> value*
Collagen I				
Convexity	52.3 ± 2.1	10.7 ± 2.1†	20.4 ± 1.3†	<.001
Concavity	51.0 ± 2.0	15.2 ± 2.1	25.6 ± 1.6	<.001
Collagen III				
Convexity	25.8 ± 3.7	15.1 ± 2.5†	18.6 ± 1.4†	.003
Concavity	26.1 ± 2.6	18.1 ± 1.6	24.0 ± 1.5	<.001
Collagen IV				
Convexity	15.1 ± 1.2	25.5 ± 1.4†	46.3 ± 1.6†	<.001
Concavity	14.1 ± 2.6	35.4 ± 1.8	45.5 ± 2.1	<.001
Fibronectin				
Convexity	49.8 ± 2.4	52.5 ± 2.3	54.0 ± 1.8†	.22
Concavity	48.5 ± 2.2	51.2 ± 4.5	44.1 ± 1.2	<.001
Laminin				
Convexity	38.1 ± 0.7†	45.2 ± 3.8†	33.5 ± 3.2†	<.001
Concavity	51.8 ± 0.5	50.3 ± 4.1	41.7 ± 4.2	<.001

Tabella 5

Laminin isoforms	Chains
Laminin-2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
Laminin-3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
Laminin-4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
Laminin-8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminin-9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminin-10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
Laminin-11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$

Tabella 6

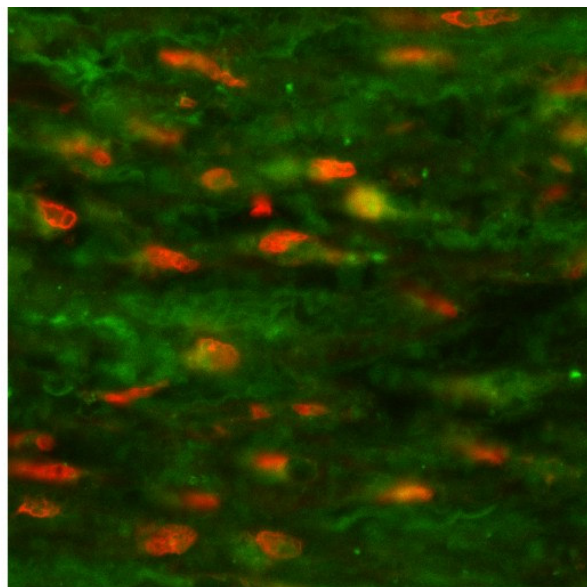
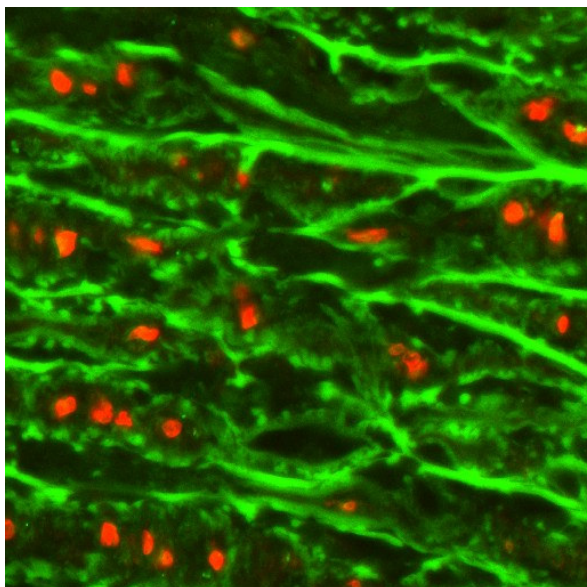


Figura 1

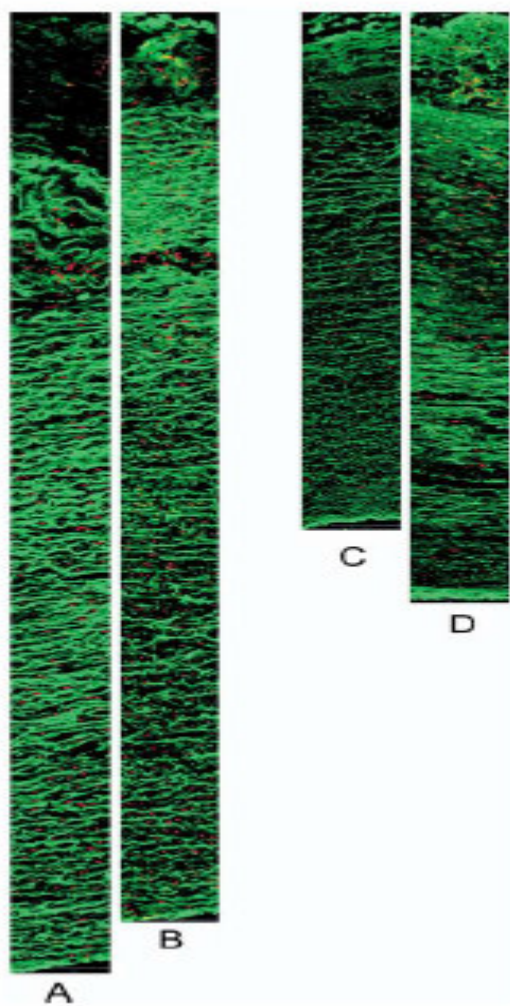


Figura 2

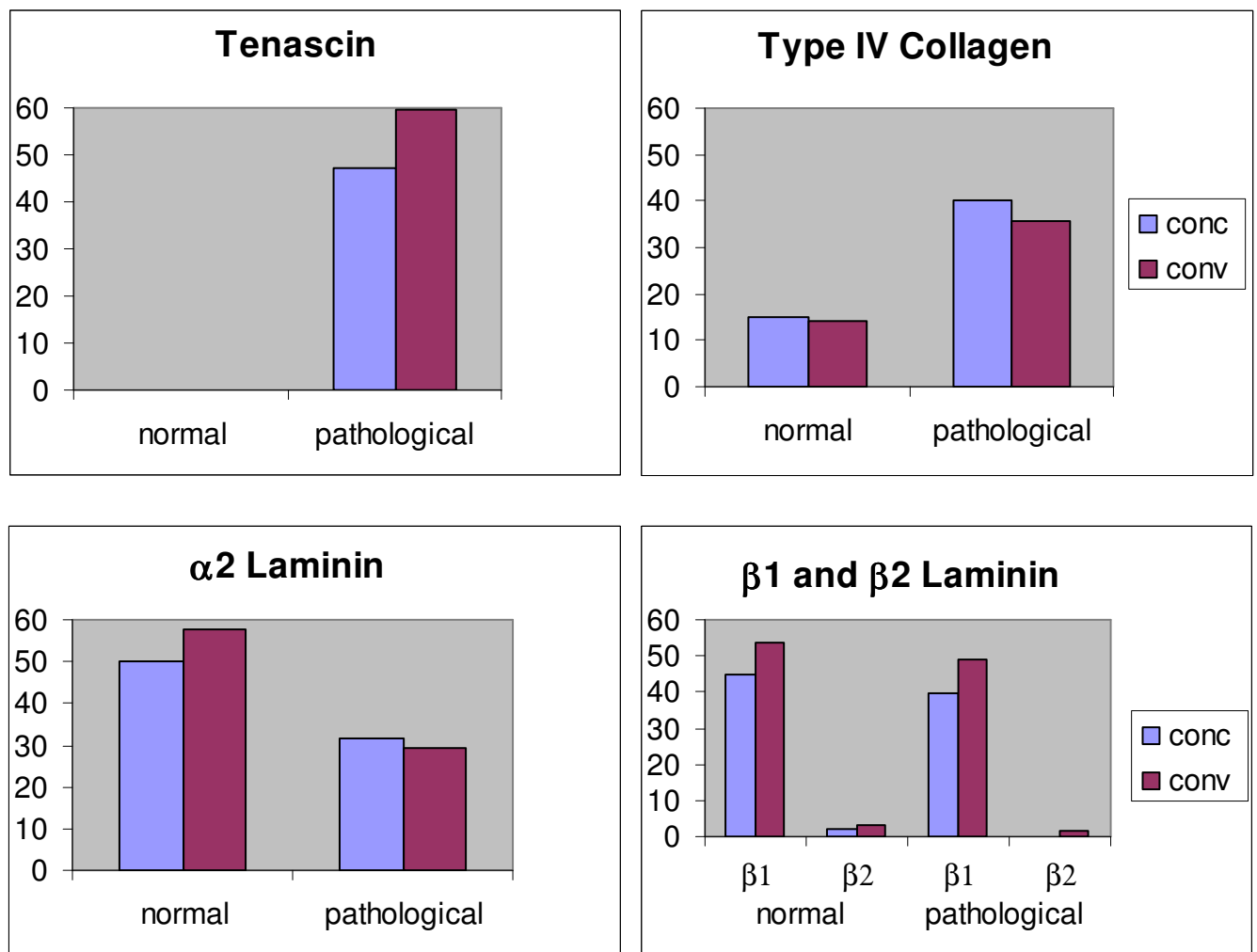


Figura 3

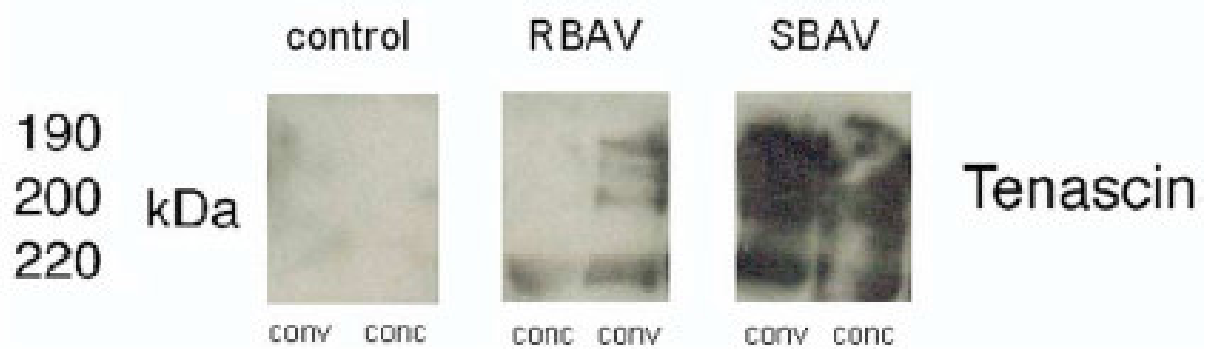
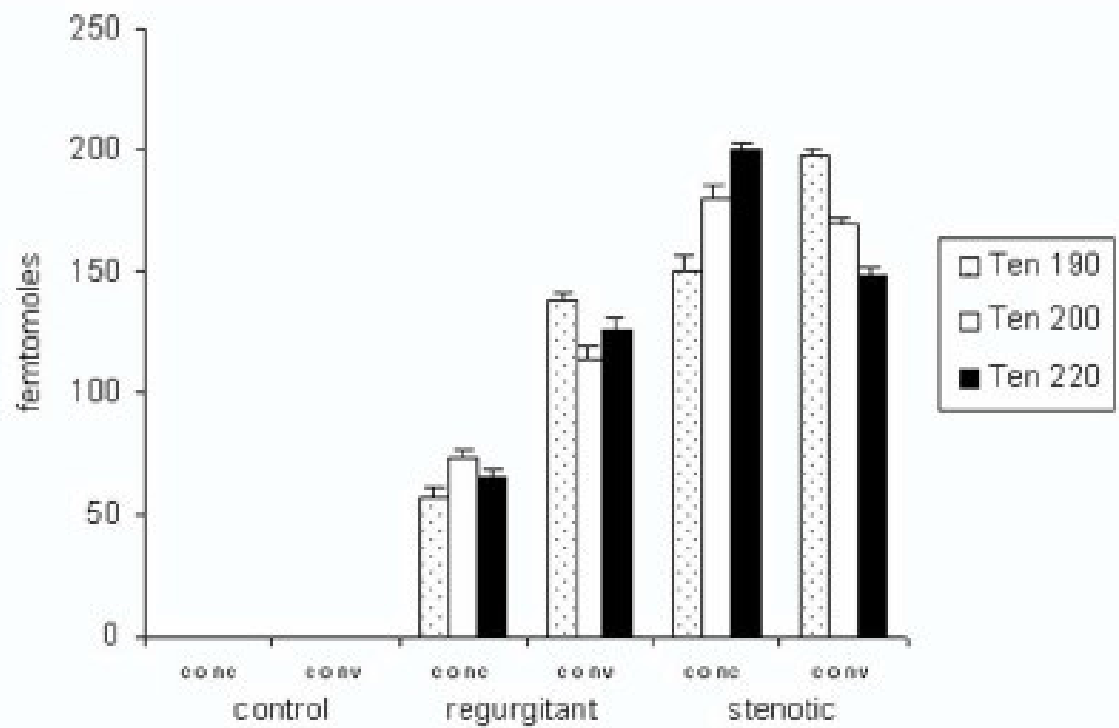


Figura 4

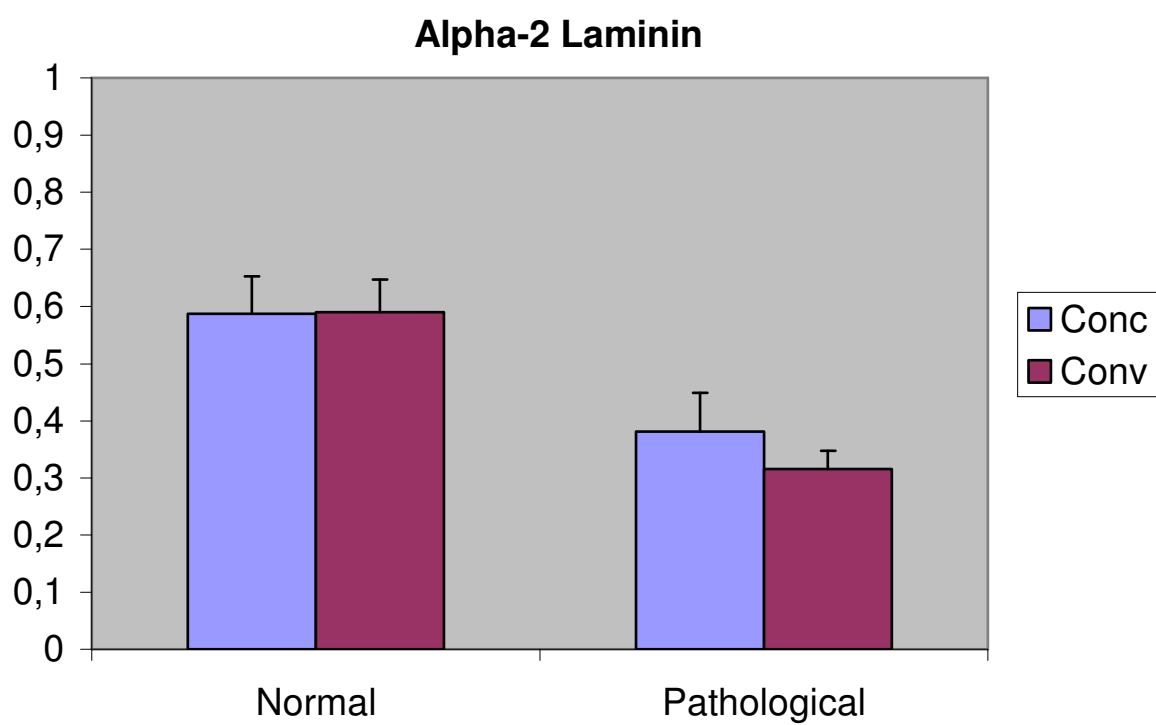
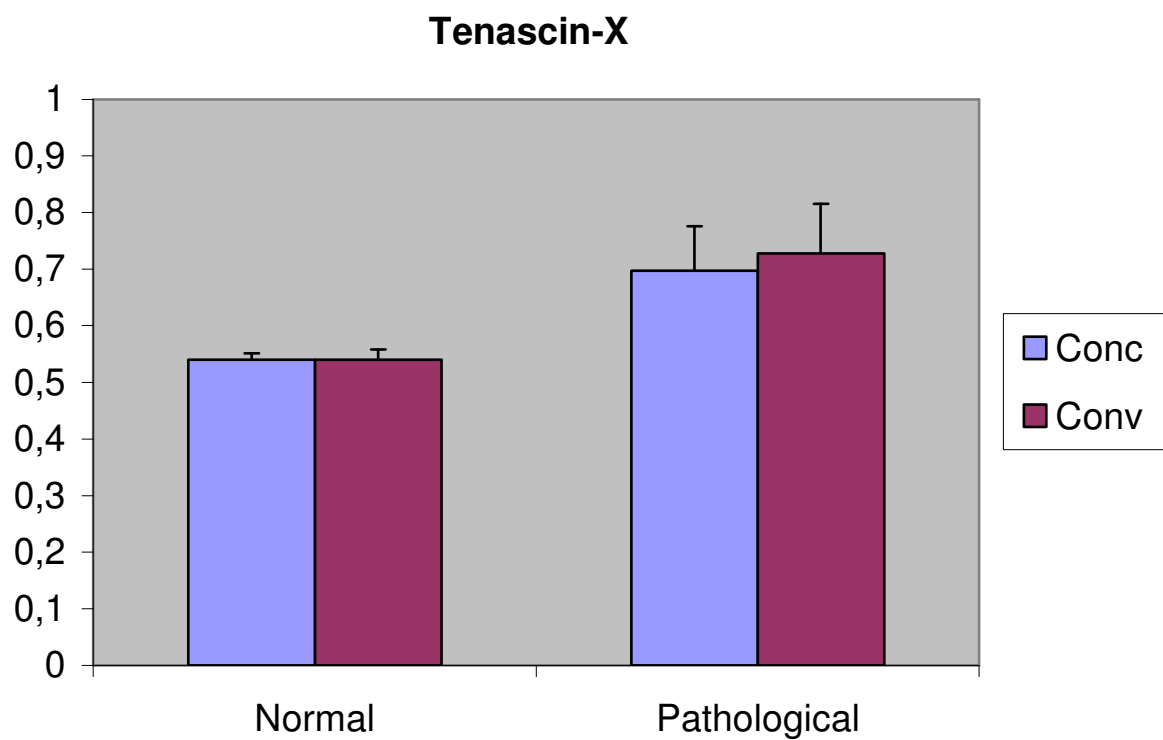


Figura 5

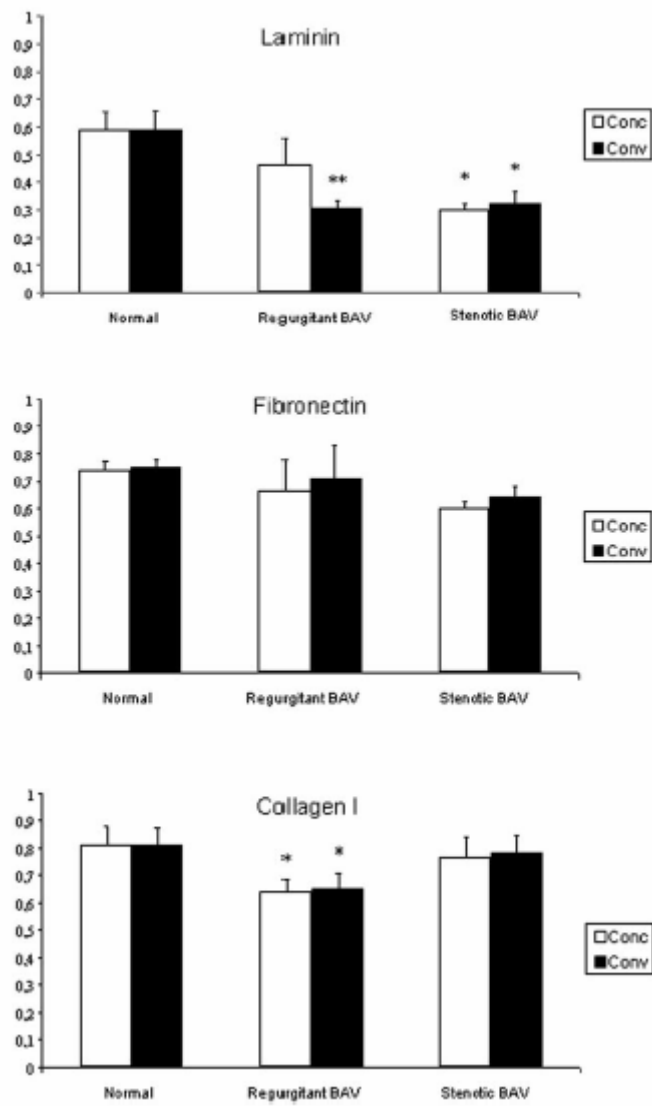


Figura 6